

FESTPHASENTECHNIK ZUR BESTIMMUNG
VON ÖSTROGENEN MIT IMMOBILISIERTEN
ANTI-ÖSTROGEN-C₆-
KONJUGAT-IMMUNGLOBULINEN

Günther J. Rußwurm

1981

Aus der I. Frauenklinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. J. Zander

FESTPHASENTECHNIK ZUR BESTIMMUNG VON ÖSTROGENEN
MIT IMMOBILISIERTEN ANTI-ÖSTROGEN- C_6 -KONJUGAT-
IMMUNGLOBULINEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Günther J. Rußwurm

aus
München

1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. E. Kuß

Mitberichterstatter: Prof. Dr. J. Zander

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.5.81



DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG
2. MATERIAL UND METHODEN
 - 2.1. Material
 - 2.1.1. unmarkierte Steroide
 - 2.1.2. markierte Steroide
 - 2.1.3. sonstige Chemikalien
 - 2.1.4. Szintillationslösung
 - 2.1.5. Antiseren
 - 2.1.6. Geräte
 - 2.2. Methoden
 - 2.2.1. Polymerisation
 - 2.2.2. Weiterverarbeitung des Gels
 - 2.2.3. Versuchsanordnung
3. ERGEBNISSE
 - 3.1. Elutionscharakteristik der Säulenmatrix
 - 3.2. Elutionscharakteristik der mit immobilisierten Antikörpern beladenen Säulen
 - 3.3. Kompetition der Bindung des Indikatorliganden an immobilisierte Antikörper
4. DISKUSSION
5. ZUSAMMENFASSUNG
6. LITERATURVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

Die modernen analytischen Methoden der "Sättigungsverfahren" (1) unterscheiden sich untereinander hauptsächlich durch ihre bindenden Reagenzien Q (z. B. Immuno-, Rezeptor-, Serumglobulin-Verfahren) und durch die Markierung der Indikatorliganden P^+ (z.B. Radio-, Enzym-, Fluoreszenz-, Spin-, Phagen-Verfahren). Zielgröße jedes der Verfahren ist der Quotient "Menge des reagenziengebundenen Indikatorliganden"/"Menge des nicht-reagenziengebundenen Indikatorliganden" = $\frac{P^+Q}{P^+} = B/F = R$. Zur Gewinnung dieser Zielgröße ist es nur in wenigen Ausnahmefällen möglich, nebeneinander vorliegende Moleküle der Art P^+ und P^+Q aufgrund eines "inneren" Signals direkt zu messen. In fast allen Verfahren ist eine vorherige Trennung, eine B/F-Trennung, in einem relativ aufwendigen Arbeitsgang notwendig, meistens dadurch, daß P^+Q durch ein zweites bindendes Protein (z.B. 2. Antikörper) präzipitiert wird, oder daß P^+ durch ein Adsorbens (z.B. Kohle) eliminiert wird.

Eine andere, anscheinend weniger arbeitsaufwendige Methode der B/F-Trennung stellt die Festphasentechnik dar. Die bindenden Makromoleküle werden immobilisiert und kommen als Festphase mit der Flüssigphase des analytischen Ansatzes in Kontakt. In diesen Fällen ist eine B/F-Trennung ohne zusätzliche Reagenzien, allein durch physikalische Maßnahmen, Filtrieren, Zentrifugieren, Magnetisieren o.ä. möglich. Zur Immobilisierung löslicher bindender Proteine werden diese entweder mit Hilfe geeigneter Reagenzien intern vernetzt oder sie werden adsorptiv oder kovalent an Trägermaterialien, Matrices, gebunden (2-5). Die adsorptive Bindung ist mit dem Nachteil der Auswaschbarkeit behaftet, die kovalente Bindung ist mit dem Nachteil der Veränderungen der Molekülstruktur und damit zumeist mit der Verminderung der Affinität behaftet. Diese Nachteile sollten durch ein viertes Immobilisierungsverfahren vermieden werden, nämlich durch den Einschluß der bindenden Makromoleküle in

das dreidimensionale Maschenwerk eines stabilen Gels. Die Poren dieses Gels müssen eng genug sein, damit das bindende Makromolekül nicht herausdiffundieren kann, sie müssen weit genug sein, damit die Liganden hineindiffundieren können. Wenn als bindende Proteine Immunglobuline und als Liganden Steroide eingesetzt werden, kann Polyacrylamid-Gel diese Bedingungen erfüllen, da sich die Größen dieser Moleküle stark unterscheiden (Immunglobuline G: 150 000 Dalton; Steroide: 300 Dalton) und da durch Variation der Monomeren-Konzentration vor der Polymerisation die Porengröße des Gels beeinflusst werden kann (6). Es war die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, Polyacrylamid-Gele mit und ohne Anti-Östrogen-Antikörpereinschlüsse zu synthetisieren und die Affinität dieses Materials zu Östrogenen zu studieren. Es sollten die Korngrößen, die Temperatur und die Inkubationsdauer variiert werden und deren Einflüsse auf die Bindung von Indikatorligand und Kompetitorligand gemessen werden. GOODFRIEND, BALL und UPDIKE haben bereits 1973 Antikörper gegen Angiotensin I in Polyacrylamid einpolymerisiert und mit diesen immobilisierten Antikörpern eine radioimmunologische Bestimmung von Angiotensin I aufgebaut (7).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Unmarkierte Steroide

Östron: (3-Hydroxy-1,3,5, (10)-Östratrien-17-on)
Östradiol-17 β : (1,3,5, (10)-Östratrien-3,17 β -diol) und
Östriol: (1,3,5, (10)-Östratrien-3,16 α -17 β -triol) von
E. Merck, Darmstadt, Deutschland. Lösung dieser Substan-
zen in 10,0 ml Methanol und Bestimmung der Konzentratio-
nen durch UV-Spektrometrie (Zeiss PMQ 2): Östron: $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 2080$, Östradiol: $\epsilon_{281 \text{ nm}} = 2120$, Östriol: $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 2150$,
(ϵ_{λ} = Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ).
Zur Herstellung der Gebrauchslösungen werden Aliquote
entnommen, unter Stickstoff eingedampft und der Rückstand
in Phosphatpufferlösung aufgenommen.

2.1.2. Markierte Steroide

(2,4,6,7- $^3\text{H}_n$)-Östron, (2,4,6,7- $^3\text{H}_n$)-Östradiol,
(2,4,6,7- $^3\text{H}_n$)-Östriol (jeweils 90,0 Ci/mmol) von New England
Nuclear Corporation, Boston, Mass., USA.

2.1.3. Sonstige Chemikalien

2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 1,4-bis-2-(4-methyl-
4-phenyloxazolyl)-bezol (POPOP) der Firma W. Zinsser,
Frankfurt, Deutschland. Bio-Solv (BBS-3) der Beckmann-
Instruments GmbH, München, Deutschland.

Phosphatpufferlösung (1/15 mol/l), pH 7,2, enthält
 NaN_3 5,0 mmol/l.

Acrylamid von E. Merck, Darmstadt, Deutschland.

N,N,N',N'-Tetramethyläthyldiamin und Riboflavin von
Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland.

NN'-Methylenbisacrylamid von Bio Rad GmbH, München,
Deutschland.

Die wäßrigen Lösungen werden mit "aqua pro injektionen" von Braun, Melsungen, Deutschland, zubereitet.

2.1.4. Szintillationslösung

100,0 g PPO und 1,25 g POPOP werden in 1,0 l Toluol gelöst. 42,0 ml dieser Lösung werden zusammen mit 117,0 ml Bio-Solv zu 1,0 l Toluol gemischt.

Jedem Zählgläschen werden 15,0 ml dieser Szintillationslösung zugesetzt.

2.1.5. Antiseren

Aus dem Serum von Kaninchen, die mit Östron-, Östradiol-17 β - oder Östriol-C₆-Konjugaten immunisiert waren (8), werden Immunglobuline durch dreimalige Fällung in 35%igem Ammoniumsulfat gewonnen (9). Der Niederschlag wird gegen 0,85%ige NaCl-Lösung (pH 8,0) solange dialysiert, bis kein Sulfat im Dialysat mehr nachzuweisen ist. Anschließend wird mit 0,85%iger

NaCl-Lösung auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt. Davon wird 1 Volumenanteil mit 19 Volumenanteilen Pufferlösung verdünnt. Diese Gebrauchslösung wird bei 4° C aufbewahrt. Es wurden die Immunglobuline der Antiseren Anti-E₁, AS B2, Anti-E₂ AS A5, und Anti-E₃ AS C4 eingesetzt.

2.1.6. Geräte

Ismatec SA-Kolbenpumpe (Typ PMP 10), Zürich, Schweiz.

Szintillationszähler Modell 2425 der Firma Packard.

Kryostat Typ K 4R vom Meßgerätewerk Lauda;

Säulchen: Tuberkulinspritzchen werden auf Volumina von 0,1 - 0,6 ml abgeschnitten und unten mit einem Teflongitter verschlossen. Anstatt des Spritzenkolbens steckt ein mit Dichtungsringen versehener Teflonadapter in der Spritze, auf den die Pumpenschläuche aufgeschraubt

werden können (Eigenfertigung).

Messingkühlblöcke mit Bohrungen für die Säulchen (Eigenfertigung).

Drahtgitter mit einer Porengröße von 200, 300, 400 μm (Reichelt, Chemietechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland).

2.2. Methoden

2.2.1. Polymerisation

5,0 g Acrylamid (2,81 mol/l) und 1,25 g N,N'-Methylenbis acrylamid (0,32 mol/l) werden im 50 ml Becherglas in 24 ml Phosphatpuffer (pH 7,2) gelöst, um eine Monomerkonzentration von 3,13 mol/l zu erhalten. Nach Zugabe von 1,0 ml Antiserumgebrauchslösung oder Pufferlösung wird die Reaktion mit 0,15 mg Riboflavin und 0,10 ml N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin unter UV-Licht gestartet. Nach einer Stunde ist die Polymerisation abgeschlossen; während dieser Zeit wird die Temperatur im Reaktionsgefäß unter 50° C gehalten (10).

2.2.2. Weiterverarbeitung des Gels

Das Gel wird mit einem Spatel durch ein Drahtgitter gedrückt (Porengröße 200 - 400 μm). Die Gelpartikel werden auf einer Nutsche mit 500 ml destilliertem Wasser gewaschen. Unmittelbar nach Abziehen des Wassers wird mit 50 ml Aceton aufgeschlemmt, nach 1 Min. das Aceton wieder abgesaugt. Dann wird das Gel 24 Stunden an der Luft getrocknet.

"Beladenes" Anti-Östradiol-Antikörpergel wird wie folgt gewonnen: 34,73 pmol ^3H -Östradiol werden in 10,0 ml Aceton gelöst und 1,0 g Trockengel darin aufgeschlemmt; das Lösungsmittel wird unter ständigem Rühren im Stickstoffstrom getrocknet.

2.2.3. Versuchsanordnung

Die präparierten Tuberkulinspritzen werden mit dem jeweiligen Gel gefüllt und auf dem Messingkühlblock auf 0°C gekühlt. Je nach Versuch werden nun markiertes Hapten allein oder in Kombination mit unmarkiertem Hapten mittels Eppendorfpipetten auf die Spritzen aufgegeben. Wenn nicht anders vermerkt, wird eine Inkubationszeit von 30 Min. abgewartet, dann der Teflonadapter aufgesteckt und mit den Pumpenschläuchen verschraubt und mit Phosphatpufferlösung mit variablem Flüssigkeitsdurchsatz eluiert. Das Eluat definierter Zeitintervalle wird in Szintillationsgläschen aufgefangen und nach Zusatz von 15 ml Szintillationslösung die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Elutionscharakteristik der Säulenmatrix

Bei gegebener Menge und Art von Säulenmatrix, Ligand und Lösungsmittel (Polyacrylamid-Gel und Östron, Östradiol oder Östriol und wäßrige Pufferlösung) hängt die Geschwindigkeit, mit der die Liganden eluiert werden, solange von der Strömungsgeschwindigkeit des Elutionsmittels ab, bis ein Grenzwert erreicht ist. Unter den gegebenen Bedingungen lag dieser Wert bei etwa 0,5 ml/min (Abb. 1).

Wird die Strömungsgeschwindigkeit konstant gehalten und die Liganden-Menge um das 5- bis 10fache gesteigert, so zeigt sich, daß wenige Minuten nach Beginn der Elution der überwiegende Teil der Liganden eluiert ist, unabhängig von der Größe der Ausgangsmenge. Unter den angegebenen Versuchsbedingungen waren in 2 Minuten etwa 80 % des eingesetzten Östradiols-17 β eluiert (Abb. 2). Wird in der graphischen Darstellung des Elutionsverhaltens die Ausgangsmenge normiert, d.h. analog der Darstellung in Abb. 1 gleich 100 gesetzt, so vereinigen sich die Elutionskurven von Abb. 2a zu einem einzigen Kurvenzug (Abb. 2b).

Die Elutionsgeschwindigkeit des Östradiols ist offensichtlich auch vom Korndurchmesser des Gels abhängig; mit abnehmendem Durchmesser steigt die Elutionsgeschwindigkeit an (Abb. 3), aber nur bei niedrigen Flußraten.

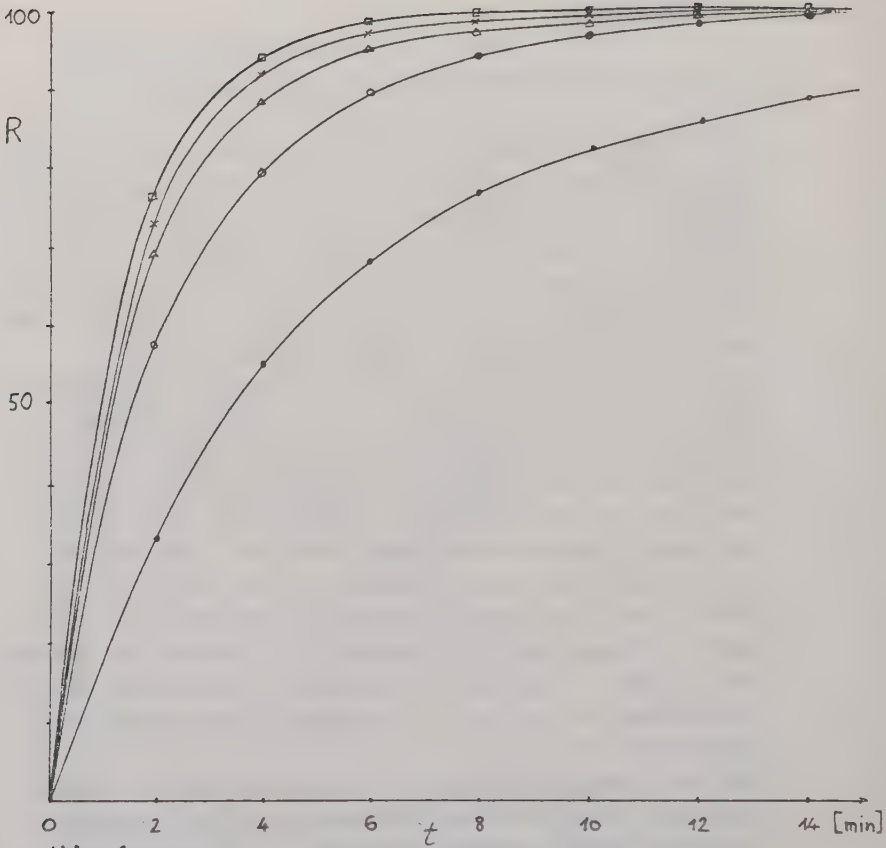


Abb. 1

Östradiol-Elutionscharakteristik der Säulenmatrix.
Abhängigkeit der Elutionsgeschwindigkeit von der
Strömungsgeschwindigkeit.

t = Elutionszeit; $R = 100 \cdot W/T$; W = Radioaktivität im
Eluat; T = eigesetzte Radioaktivität.

Durchfluß: $\bullet \hat{=} 0,12$ ml/min; $\circ \hat{=} 0,24$ ml/min;

$\triangle \hat{=} 0,36$ ml/min; $\times \hat{=} 0,48$ ml/min; $\square \hat{=} 0,96$ ml/min;

22 mg Trockengel; Korngröße 300 μ m; 208 pg (0,764 pmol)
3H-Östradiol in 200 μ l Phosphatpufferlösung (0°C); 30 min
Inkubation bei 0°C; 2-Min.-Fraktionen wurden aufgefangen
und deren Radioaktivität gemessen. 73500 cpm $\hat{=} 100\%$;
eingezeichnet wurden Mittelwerte aus jeweils drei Einzel-
messungen.

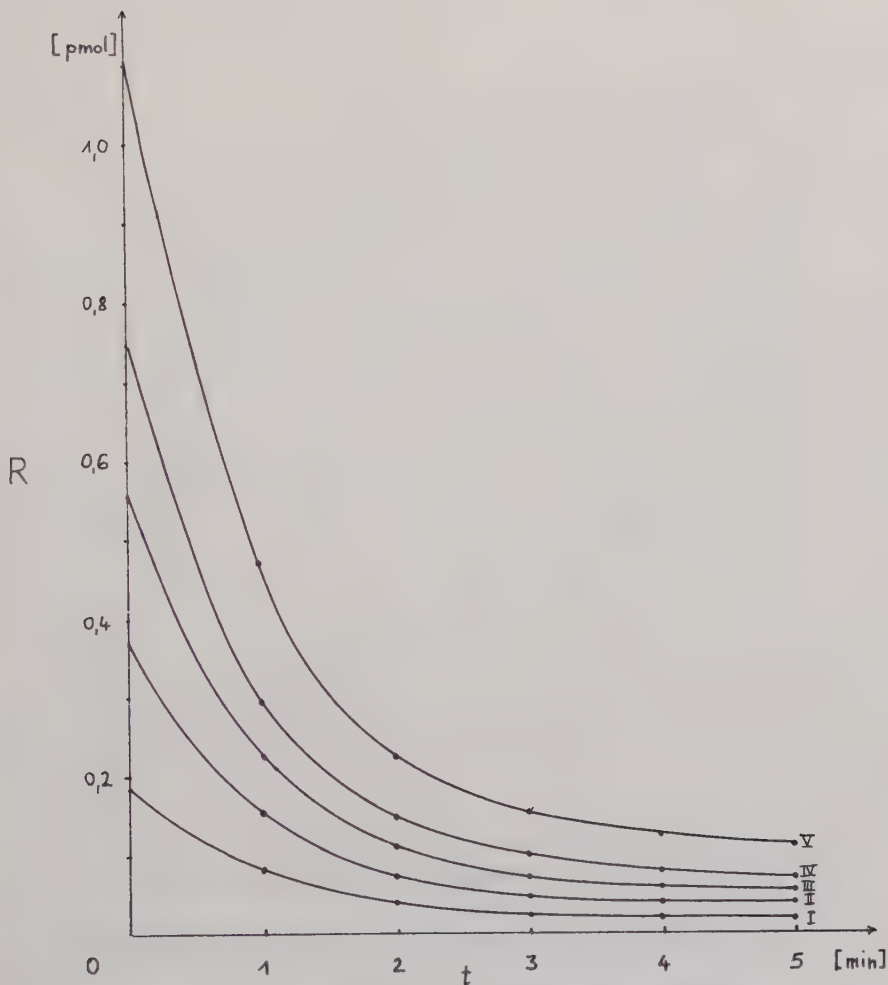


Abb. 2a Östradiol- Elutionscharakteristik der Säulenmatrix.
 Abhängigkeit der Elutionsgeschwindigkeit von der
 Östradiolmenge. t = Elutionszeit; $R = T - W$;
 T = eingesetzte Radioaktivität; W = Radioaktivität
 im Eluat; Durchfluß : 0.48 ml/min;
 ^3H -Östradiolmengen: I $\hat{=}$ 0,184 pmol; II $\hat{=}$ 0,368 pmol;
 III $\hat{=}$ 0,552 pmol; IV $\hat{=}$ 0.735 pmol; V $\hat{=}$ 1,104 pmol;
 sonst gleiche Bedingungen wie in Abb. 1 beschrieben.

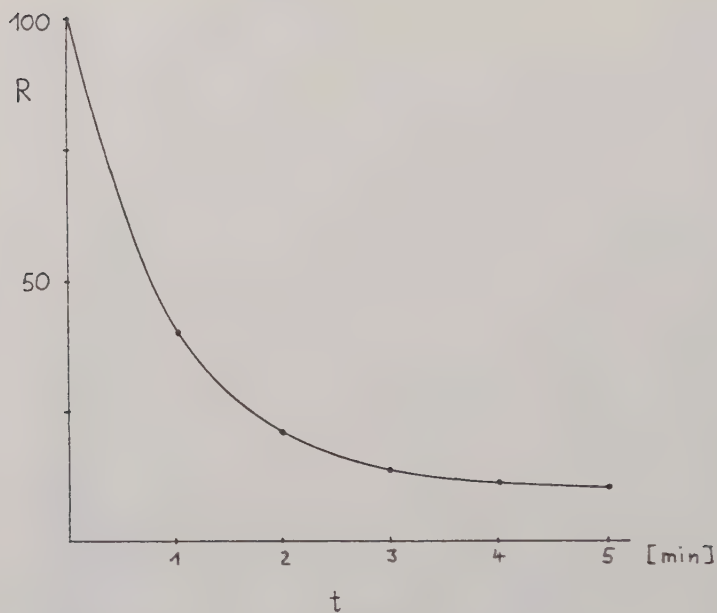


Abb. 2b Östradiol-Elutionscharakteristik der Säulenmatrix.

Kurven der Abb. 2a nach $R = W/T \cdot 100$ aufgetragen.

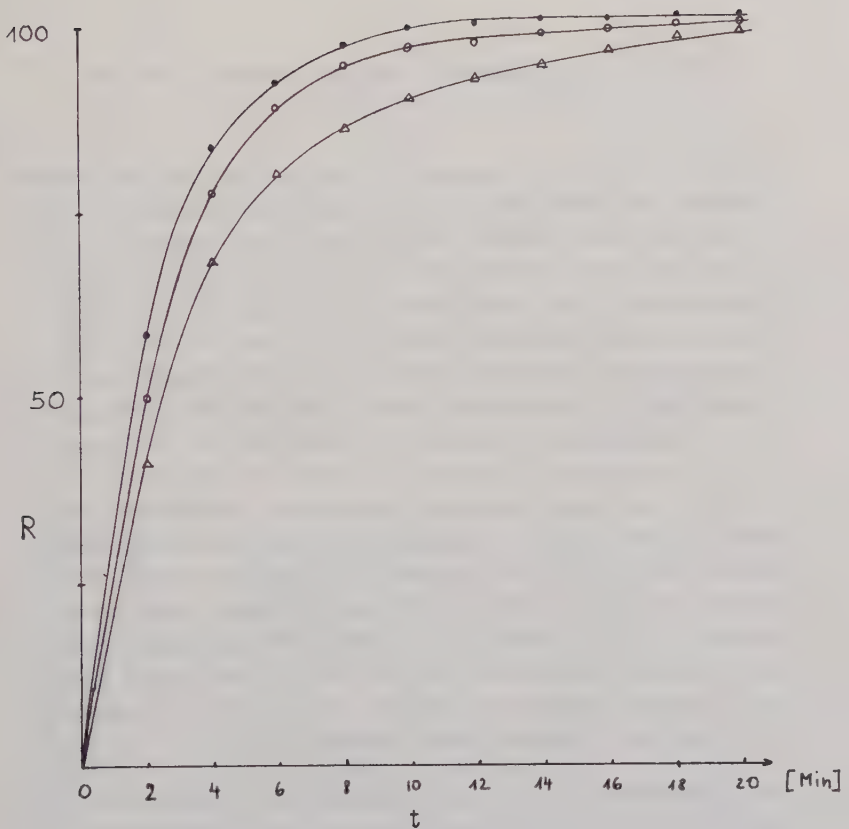


Abb. 3 Östradiol-Elutionscharakteristik der Säulenmatrix.
Abhängigkeit der Elutionsgeschwindigkeit von der
Gelkorngroße.

t = Elutionszeit; $R = \frac{W}{T} \cdot 100$; W = Radioaktivität
im Eluat; T = eingesetzte Radioaktivität;

Gelkorndurchmesser: $\bullet \hat{=} 200 \mu\text{m}$; $\circ \hat{=} 300 \mu\text{m}$; $\Delta \hat{=} 400 \mu\text{m}$;

Durchfluß: 0,24 ml/min, sonst Bedingungen wie in Abb.1

3.2. Elutionscharakteristik der mit immobilisierten Antikörpern beladenen Säulen.

Östradiol-17 β sowie Östron und Östriol wurden auf Säulen gegeben, in deren Matrix die korrespondierenden Antikörper einpolymerisiert waren. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde mit Aceton oder mit wäßriger Pufferlösung eluiert. Die graphische Darstellung der Aceton-Elution ergab Diagramme, die in etwa der in Abb. 1 dargestellten Elution des Östradiols von der antikörperfreien Matrix entsprachen (Abb. 4, Kurve II). Die graphische Darstellung der Elution mit wäßriger Pufferlösung ergab ein anderes Bild (Abb. 4, Kurve I): Die Elution der mit den immobilisierten Antikörpern korrespondierenden Liganden verlief verzögert und offenbar zweiphasig: Rasche Elution in der ersten und langsame Elution in der zweiten Phase. Zur Deutung dieses Befundes wurde angenommen, daß mit Aceton die gesammte aufgetragene Menge des Liganden gleichmäßig eluiert wird, daß jedoch mit der wäßrigen Lösung die in zwei verschiedenen Zuständen vorliegenden Liganden verschiedenartig eluiert werden.

Zur Auswertung der in den Elutionsdiagrammen enthaltenen Daten wird die in der Elutionszeit von 0 - 2 Minuten eluierte Ligandenmenge als 80 % der Menge F (freier Ligand) definiert. Die Menge B des gebundenen Liganden wird als Differenz zwischen der eingesetzten Menge T und der Menge F definiert, $T - F = B$. Die Variation der Inkubationszeit zwischen 20 und 120 Minuten ergab keine Beeinflussung der Mengen von F und B; (Tab. 1). Die Variation der Korngröße bei konstanter Gel- und Ligandenmenge zeigte, daß mit sinkender Korngröße die in einer gegebenen Gel-Menge enthaltene Bindermenge abfällt (Tab. 2). Die Variation der Temperatur zeigte, daß die F-Fraktion mit steigender Temperatur größer wird (Abb. 5).

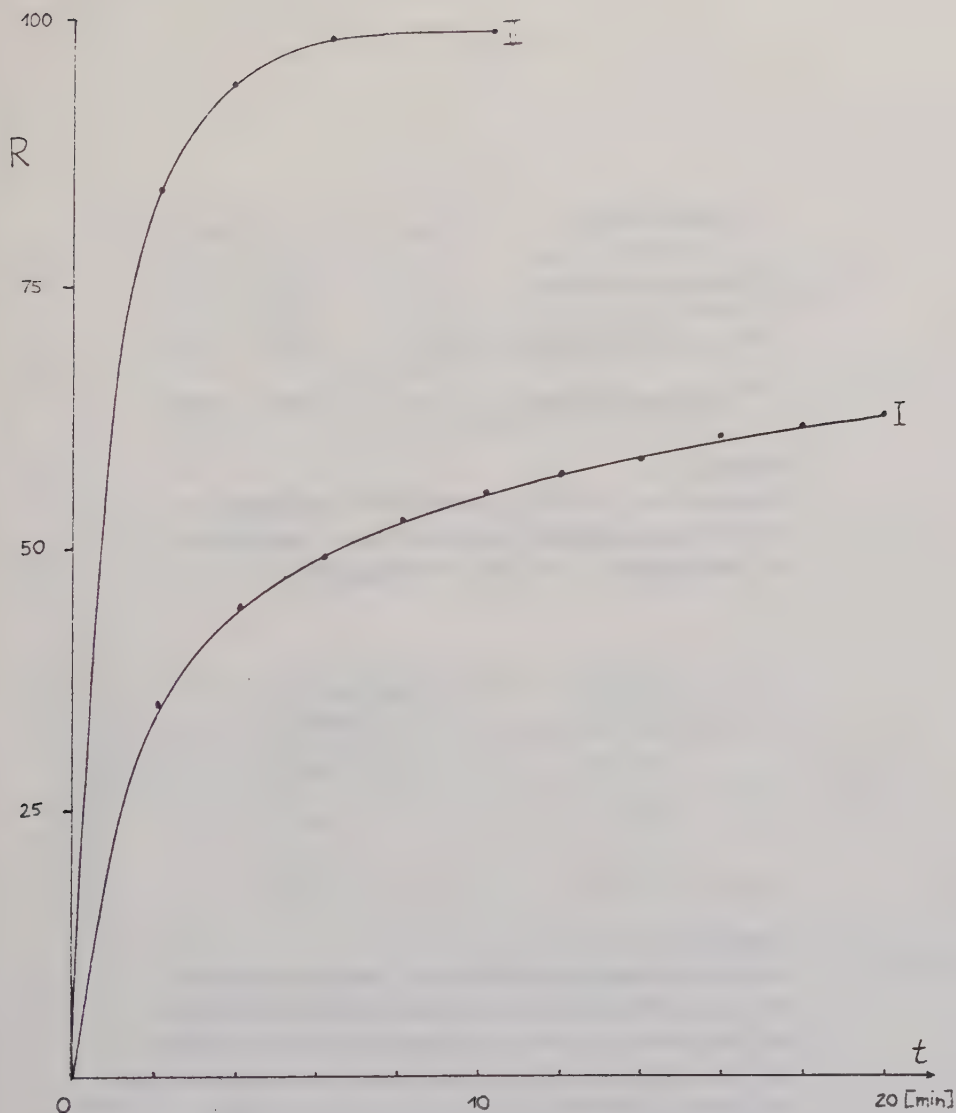


Abb. 4

Östradiol-Elutionscharakteristik der Polyacrylamid-Säulen mit immobilisiertem Anti-Östradiol-Immunglobulin.

Abhängigkeit der Elutionsgeschwindigkeit vom Elutionsmittel.

t = Elutionszeit; $R = 100 \cdot W/T$; W = Radioaktivität im Eluat; T = eingesetzte Radioaktivität.

I : Inkubation und Elution mit Phosphatpuffer-Lösung

II : Inkubation und Elution mit Aceton

22 mg Polyacrylamid-Trockengel mit einpolymerisiertem Anti-Östradiol-Antikörper; Korngröße: $400 \mu m$; $0,764 \mu mol$ 3H -Östradiol in 200 μl Lösungsmittel 30 min bei $0^\circ C$ inkubiert und mit $0,48 \text{ ml/min}$ Lösungsmittel eluiert; Radioaktivität der 2-Min-

Inkubationszeit in min	20	30	120
^3H -Östronbindung	42%	43%	43%
^3H -Östradiolbindung	55%	58%	57%
^3H -Östriolbindung	58%	61%	61%

Tabelle 1 :

Bindung von je 200 pg markiertem Östrogen an den entsprechenden immobilisierten Antikörper in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Gelkorn- Durchmesser	^3H -Östradiol Bindung von
400 μm	100
300 μm	84
200 μm	72

Tabelle 2 :

Einfluß der Gelkorngröße auf die Bindergröße
Ein Anti-Östradiol-Antikörper-Polymerisat wird zu je einem Teil durch Gitter der Maschenweite 400 μm , 300 μm , 200 μm gedrückt. Nach Inkubation mit 200 pg ^3H -Östradiol und anschließender Elution wird der gebundene Anteil des Liganden (bzw. die im Gel verbliebene Radioaktivität) gemessen und für das " 400 μm - Gel " gleich 100 gesetzt. (Inkubationszeit, Lösungsmittelmenge, Temperatur und Elutionsgeschwindigkeit wie bei Abb. 4)

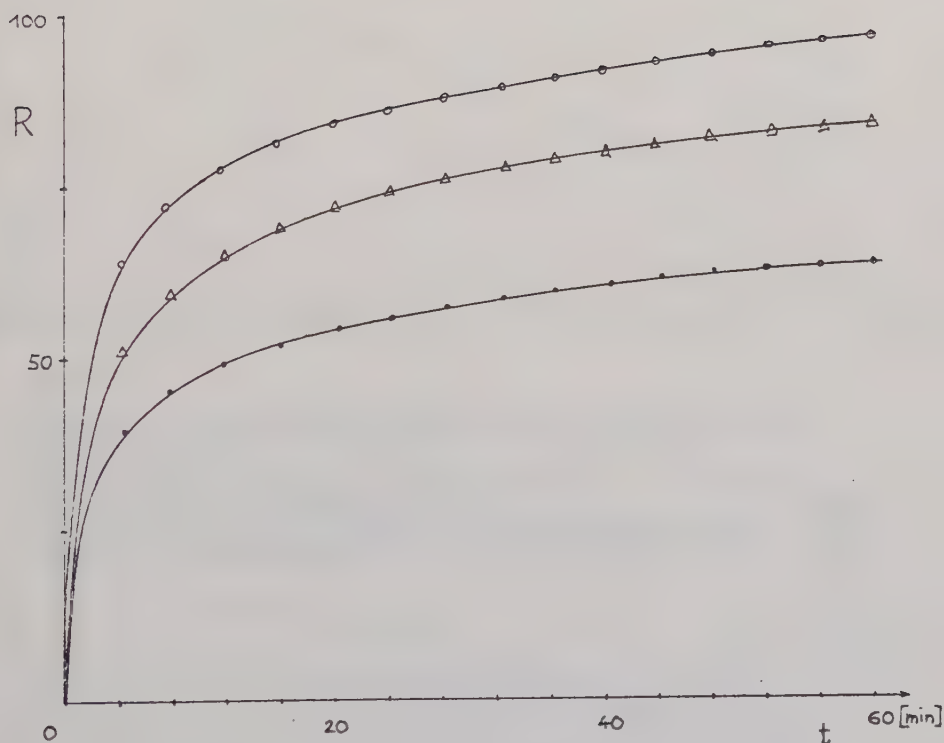


Abb. 5

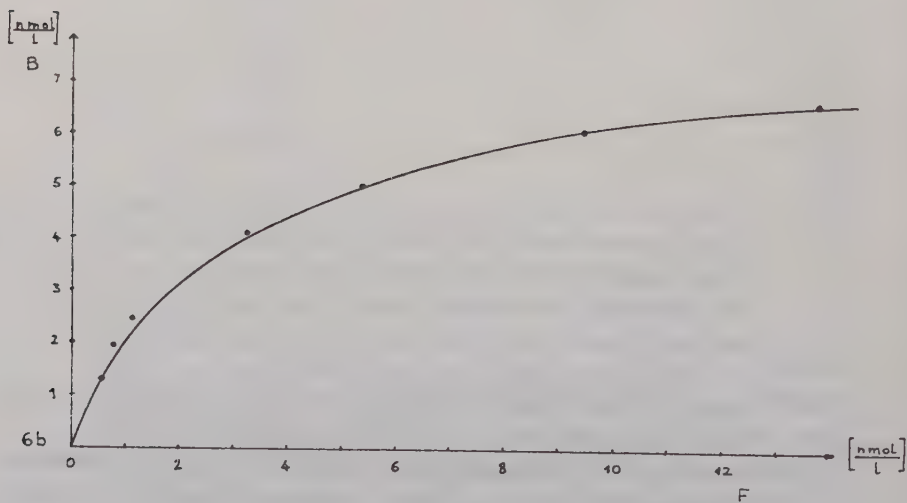
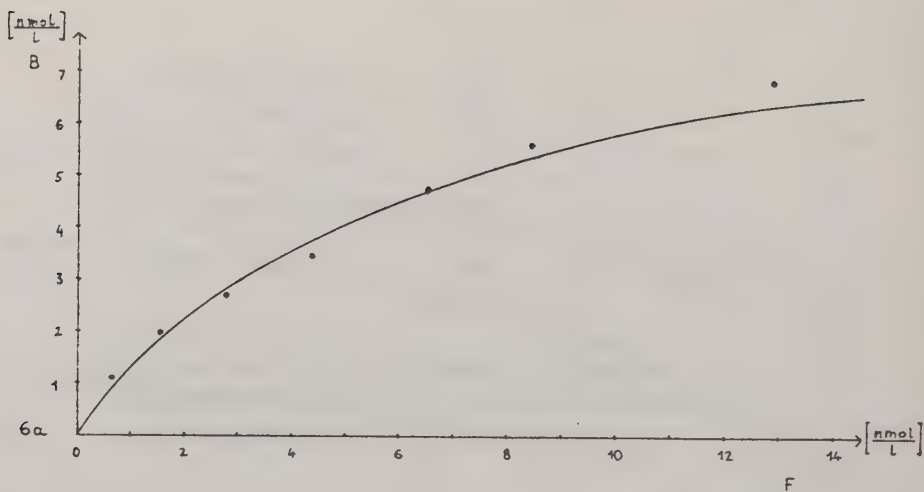
Östradiol - Elutionscharakteristik der Polyacrylamid - Säule mit immobilisiertem Anti - Östradiol - Immunglobulin

Abhängigkeit der Elutionsgeschwindigkeit von der Temperatur.

t = Elutionszeit; $R = W/T \cdot 100$; W = Radioaktivität im Eluat; T = eingesetzte Radioaktivität;

Inkubation und Elution mit Phosphatpuffer bei verschiedenen Temperaturen: • $\triangle$ 0°C; $\triangle$ 20°C; o 35°C;

sonst gleiche Bedingungen wie in Abb. 4 beschrieben.



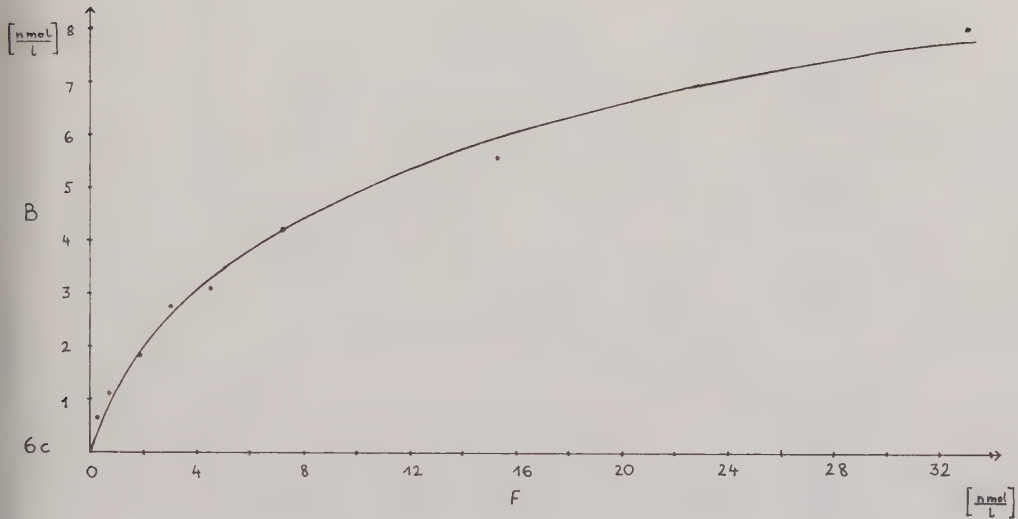


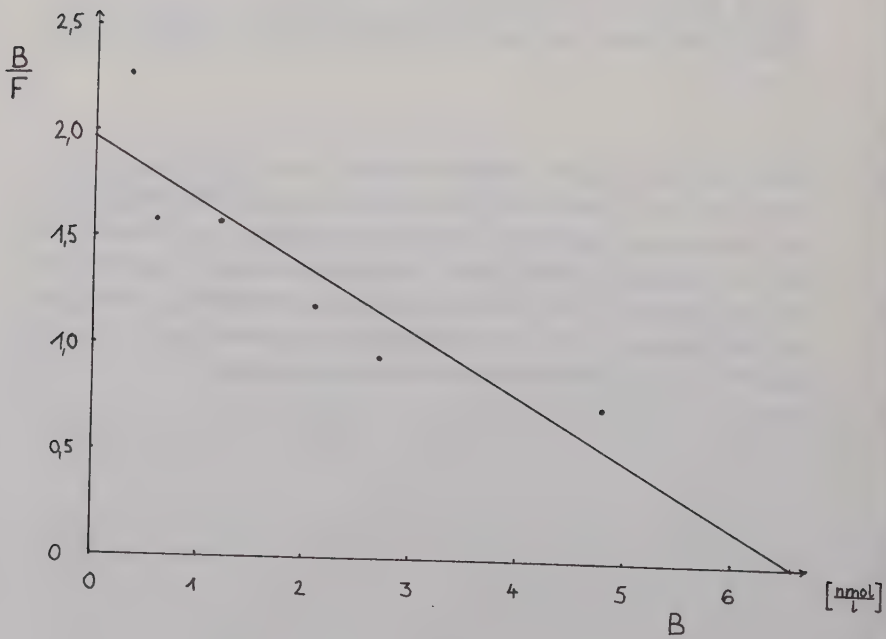
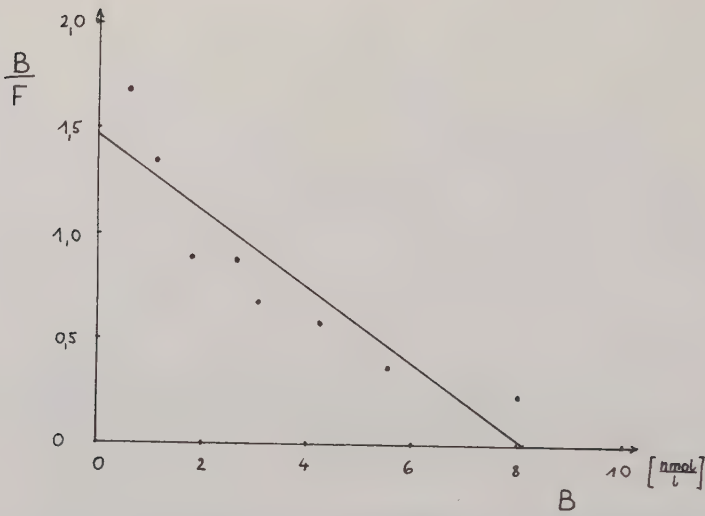
Abb. 6

Bindungsisothermen von Östradiol (a), Östriol (b) und Östron (c) mit den korrespondierenden immobilisierten Immunglobulinen.

$B = T - F$; T = eingesetzte Radioaktivität; F = im 2-Min-Eluat enthaltene Radioaktivität $\cdot 5/4$.

Die Werte von B und F werden als Konzentrationen angegeben und nach LANGMUIR/MICHAELIS-MENTEN aufgetragen.

- 3.2. Durch Variation der Liganden-Menge werden Bindungsdaten erhalten, mit denen die üblichen Bindungsisothermen für die jeweiligen Systeme dargestellt werden: die Darstellung der Bindungsisothermen nach LANGMUIR/MICHAELIS-MENTEN ist in Abb. 6a,b,c die Darstellung nach SCATCHARD in Abb. 7a, b,c aufgeführt. Aus den SCATCHARD-Diagrammen wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Bindungsdaten erhalten.



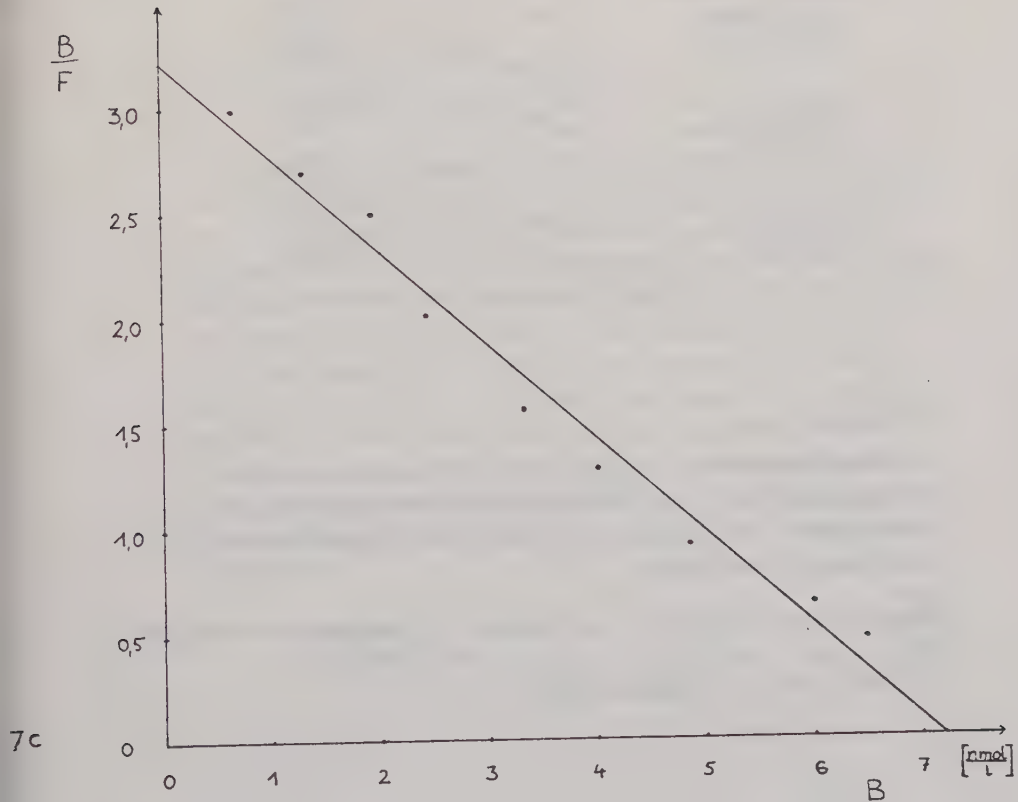


Abb. 7

Bindungsisothermen von Östron (7a), Östradiol-17 β (7b)
und Östriol (7c) mit den korrespondierenden immobilisierten Immunglobulinen

Auftragung nach SCATCHARD, gleiche Daten wie in Abb. 6

Geradengleichungen für $B = x$ und $B/F = y$:

7a) $y = - 0,178 x + 1,446$; $r = - 0,901$

7b) $y = - 0,299 x + 1,966$; $r = - 0,893$

7c) $y = - 0,448 x + 3,226$; $r = - 0,990$

r ist der Korrelationskoeffizient

Immobilisierter Anti-Östron- Antikörper	$K_{ass} = 1,7 \cdot 10^8 \frac{1}{\text{mol}}$
	$q = 8,16 \cdot 10^{-9} \frac{\text{mol}}{1}$
Immobilisierter Anti-Östradiol- Antikörper	$K_{ass} = 2,9 \cdot 10^8 \frac{1}{\text{mol}}$
	$q = 6,6 \cdot 10^{-9} \frac{\text{mol}}{1}$
Immobilisierter Anti-Östriol- Antikörper	$K_{ass} = 4,5 \cdot 10^8 \frac{1}{\text{mol}}$
	$q = 7,2 \cdot 10^{-9} \frac{\text{mol}}{1}$

Tabelle 3

Bindungskonstanten (K_{ass}) und Konzentrationen der Bindungsstellen (q) von immobilen Anti-Östrogen-Antikörpern bei Reaktion mit den jeweils spezifischen, markierten Östrogenen.

Mobiler Anti-Östradiol- Antikörper (Gleichgewichtsdialyse):
 $K_{ass} = 2,4 \cdot 10^9 \frac{1}{\text{mol}}$; $q = 13,65 \cdot 10^{-9} \frac{\text{mol}}{1}$;
 (LINK, 1974, unveröffentlicht)

3.3. Konkurrenz der Binder des Indikatorliganden an immobilisierte Antikörper.

Als Indikator-Liganden / Konkurrent-Liganden wurden die Paare ^3H -Östron/Östron, ^3H -Östradiol-17 β / Östradiol-17 β und ^3H -Östradiol / Östriol eingesetzt, die jeweils um Bindungsstellen der korrespondierenden in Polyacrylamid-Gel immobilisierten Antikörper konkurrieren.

In Gegenwart von "kaltem" Östrogen (Konkurrentligand) wird mehr Indikator-Ligand in der F-Fraktion gefunden. Das Inkrement ist von der Menge des zugesetzten Konkurrentliganden abhängig (Abb. 8a, b). Die Kenngrößen der Elutionscharakteristika können zu "Standardkurven" zusammengefaßt werden (Abb. 9a, b, c). Die "Östron-Standard-Kurve" kommt wegen ihrer Flachheit nicht zur Darstellung.

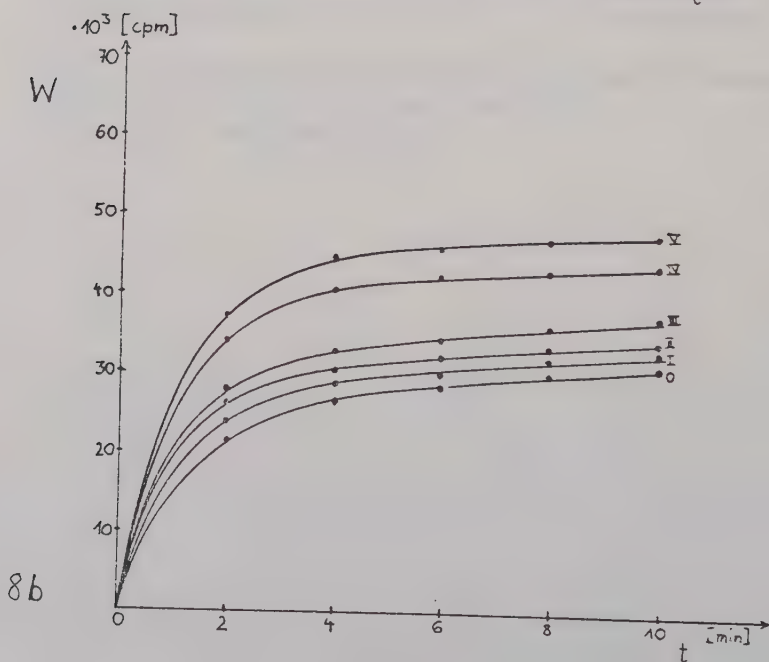
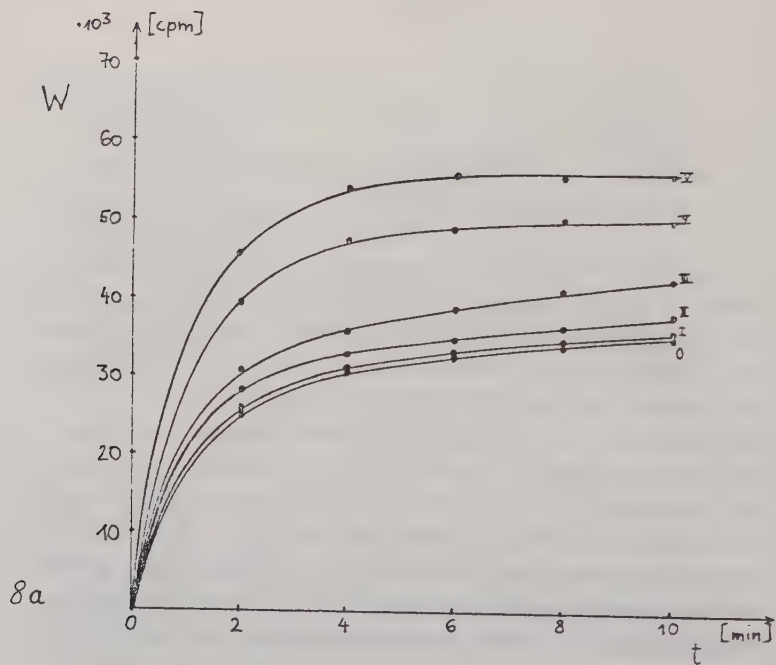


Abb. 8a: Einfluß variabler Östradiolmengen auf die Elutionscharakteristik von ^3H -Östradiol.

t = Elutionszeit; eingesetzte Radioaktivität:

T = 0,764 pmol ^3H -Östradiol entsprechend 72500 cpm;

W = Radioaktivität im Eluat; sonst gleiche Bedingungen wie in Abb. 4 beschrieben.

Östradiolmengen: (Kurve 0 : ohne Östradiol)

Kurve I: 0,073 pmol; Kurve II: : 0,184 pmol;

Kurve III: 0,368 pmol; Kurve IV : 1,838 pmol;

Kurve V: 3,677 pmol;

Abb. 8b: Einfluß variabler Östriolmengen auf die Elutionscharakteristik von ^3H -Östriol.

t = Elutionszeit; eingesetzte Radioaktivität:

T = 0,722 pmol ^3H -Östriol entsprechend 67500 cpm;

W = Radioaktivität im Eluat; 22 mg Trockengel mit immobilisiertem Anti-Östriol-Antikörper; sonst Bedingungen wie in Abb. 8a.

Östriolmengen: (Kurve 0 : ohne Östriol)

Kurve I: 0,069 pmol; Kurve II : 0,147 pmol;

Kurve III: 0,347 pmol; Kurve IV : 1,736 pmol;

Kurve V: 3,472 pmol;

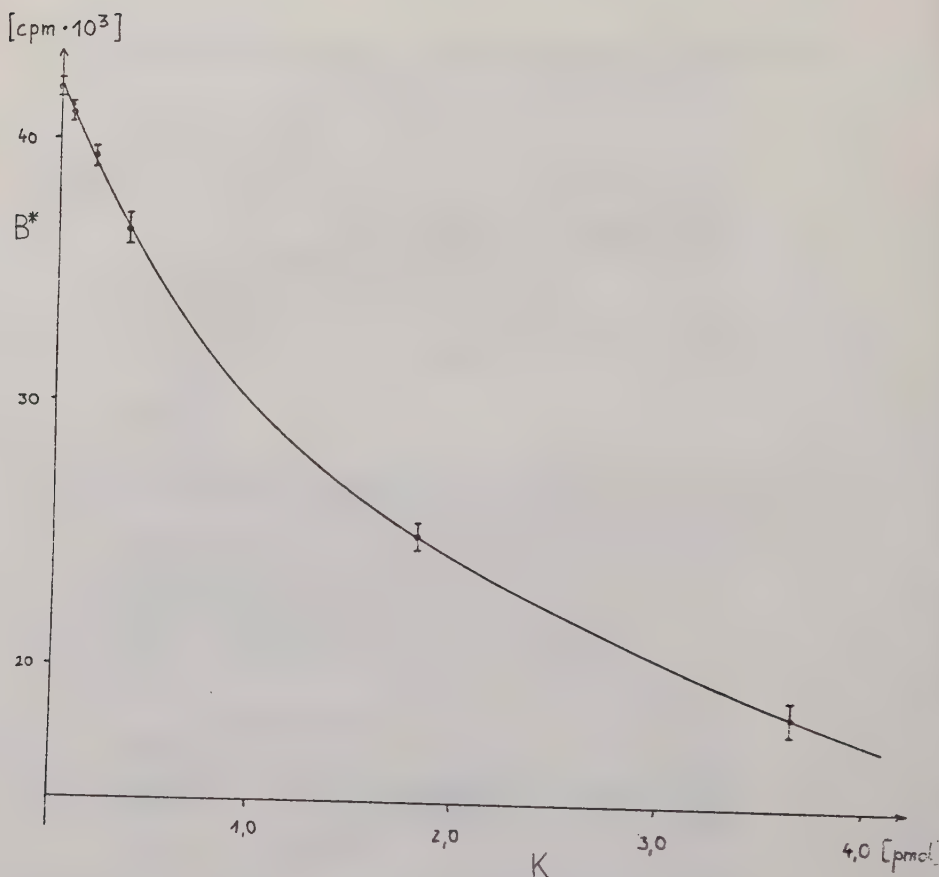


Abb. 9a

Standard-Kurve zur Östradiolbestimmung mit immobilisiertem Anti-Östradiol-Immunglobulin.

K = Kompetitormenge (gleiche Östradiolmenge wie in Abb. 8a);
 die Messwerte sind Mittelwerte aus fünfzehn Einzelbestimmungen;
 aus diesen Einzelbestimmungen wurde für jeden Kurvenpunkt
 die Standardabweichung σ errechnet und eingezeichnet;
 sonst gleiche Bedingungen wie in Abb. 8a .

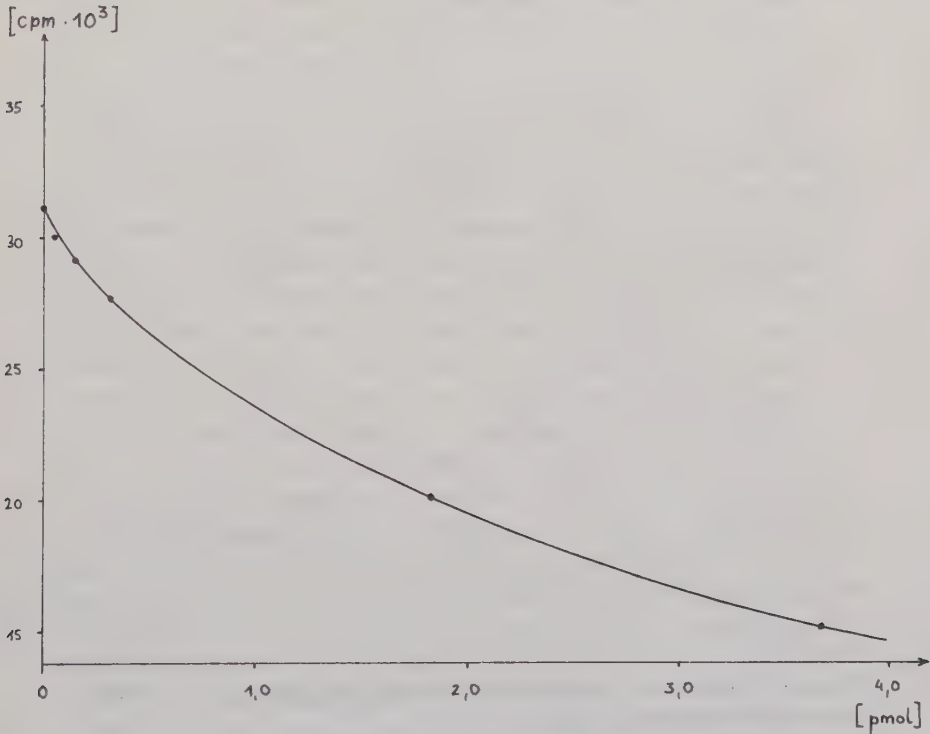


Abb. 9 b

Standard-Kurve zur Östradiolbestimmung mit immobilisiertem Anti-Östradiol-Immunglobulin bei "aufgetrocknetem" 3H -Östradiol; sonst gleiche Bedingungen wie in Abb. 9 a, die Kurvenpunkte sind Mittelwerte aus drei Einzelbestimmungen.

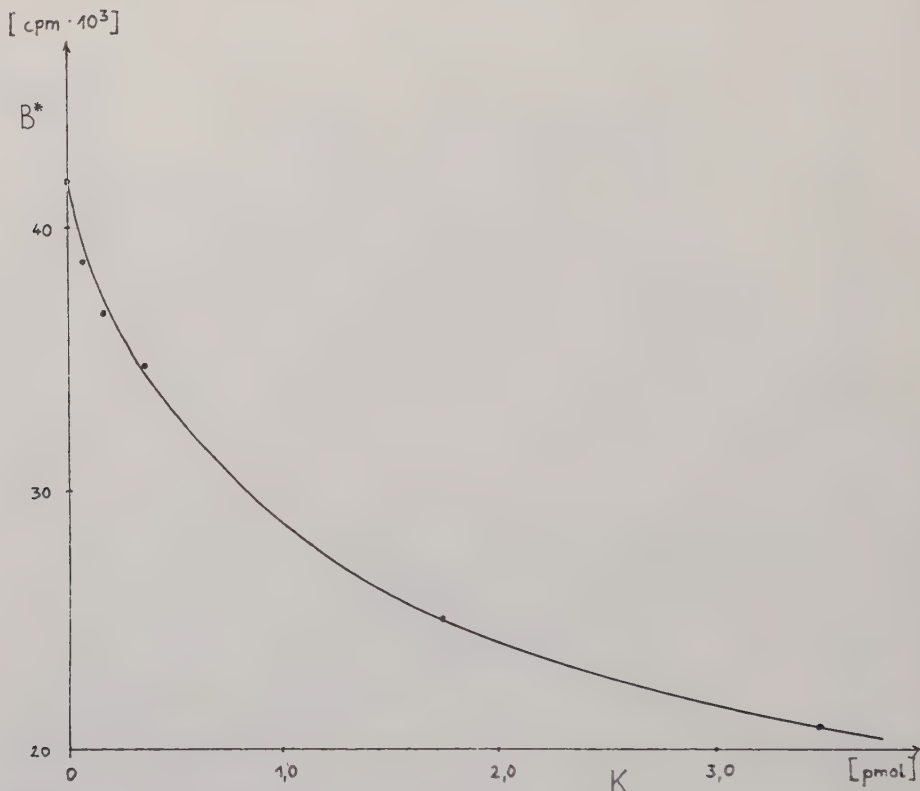


Abb. 9c

Standard-Kurve zur Östriolbestimmung mit immobilisiertem Anti-Östriol-Immunglobulin.

K = Kompetitormenge (gleiche Östriolmengen wie in Abb. 8b)

Abb. 9

Standard-Kurven zur Bestimmung von Östradiol und Östriol mit immobilisierten Immunglobulinen.

Für $t = 0$ gilt: $T_0 - F_0 = B_0$; laut Definition ist $F_0 = W_{(2 \text{ min})} \cdot 5/4$; wie aus Abb. 8 abschätzbar, gilt näherungsweise: $W_{(2 \text{ min})} \cdot 5/4 \approx W_{(4 \text{ min})}$

($W(t)$ = Radioaktivität im Eluat nach t Minuten); daraus folgt:

$T_0 - W_{(4 \text{ min})} = B^*$; damit gilt: $B^* \approx B_0$. In Abb. 9 a-c wurde B^* gegen die Kompetitormenge K aufgetragen.

4. DISKUSSION

Das hier beschriebene heterogene System mit den Liganden P (Östron, Östradiol-17 β oder Östriol) und den Bindern Q (Anti-Östron-, Anti-Östradiol-17 β - oder Anti-Östriol-antiserum) unterscheidet sich von den üblichen homogenen Systemen dadurch, daß der Binder in ein Polyacralamid-Gel eingebettet ist, dessen Porengröße die Diffusion der Liganden- und Lösungsmittel-Moleküle, nicht jedoch die der Binder-Moleküle erlaubt und dadurch, daß sich die Reaktionspartner in maschinell eluierbaren Säulchen befinden. Wie in üblichen homogenen Systemen (Lösungen), so stellt sich jedoch auch hier ein Reaktionsgleichgewicht zwischen Liganden und Bindern ein, das durch das Massenwirkungsgesetz beschrieben werden kann (Gleichung 1a, 1b). Die darin enthaltenen Konzentrationsangaben beziehen sich auf das Systemvolumen (hier auf das Gel-Volumen); es resultiert eine apparente Assoziationskonstante (K_{Gel}), die sich von der "inneren" (intrinsic) Assoziationskonstante K der reversiblen Reaktion $P + Q = PQ$ als Folge der Effekte der Immobilisierung des Binders unterscheidet. Die Effekte der Immobilisierung werden wie folgt klassifiziert (11).

1. Änderung der Konformation des Binders
2. Änderung der Verteilung des Liganden
3. Änderung der Mikro-Umgebung der Bindungsregion von Binder und Ligand.
4. Änderung des Widerstandes der Liganden-Diffusion.

Diese Effekte führen offenbar dazu, daß für K_{Gel} niedrigere Werte gefunden werden als für die Assoziationskonstanten der gleichen Reaktionspartner vor der Immobilisierung des Binders (Tab. 3). Die Ausbeute an immobilisierten Antikörpern liegt bei etwa 50 %; sie vermindert sich mit der Verkleinerung der Gelkörner offenbar als Folge der vergrößerten Oberfläche (Tab. 2).

$$\text{Gl. 1a: } K^*_{\text{Gel}} = \frac{(P^*Q)_{\text{Gel}}}{(P^*)_{\text{Gel}} (Q)_{\text{Gel}}}$$

$$\text{Gl. 1b: } K_{\text{Gel}} = \frac{(PQ)_{\text{Gel}}}{(P)_{\text{Gel}} (Q)_{\text{Gel}}}$$

Zur Ermittlung der K- und q-Werte über die Bindungsisothermen (Abb. 6, 7) müssen die Größen B und F bzw. T bekannt sein. Im hier beschriebenen System steht die Konzentration der freien Liganden im Gel $(P^*)_{\text{Gel}}$ in der Prae-Elutionsphase im Diffusionsgleichgewicht mit der Konzentration des gleichen Liganden im Elutionsmittel außerhalb des Gel $(P^*)_{\text{EL}}$. Mit Beginn der Elution wird in erster Näherung die gesamte Menge an "freiem" Liganden, d. h. $(P^*)_{\text{Gel}} V_{\text{Gel}} + (P^*)_{\text{EL}} V_{\text{EL}}$ eluiert (V:Volumen), und zwar infolge der langsamen Dissoziation von $(P^*Q)_{\text{Gel}}$ und der raschen Elution von $(P^*)_{\text{Gel}} + (P^*)_{\text{EL}}$ praktisch ausschließlich das in der Prae-Elutionsphase "frei" gewesene P^* . Da V_{EL} sehr klein gehalten werden kann, ist der entsprechende Term zu vernachlässigen. Unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen, Elutionsgeschwindigkeit (Abb. 1), Ligandenmenge (Abb. 2), Gel-Korngröße (Abb. 3), Temperatur (Abb. 5) ist damit zu rechnen, daß innerhalb einer bestimmten Zeit ein bestimmter Anteil des "freien" Liganden eluiert wird (z. B. in 2 Min. 80 %). Es ist also möglich, durch Extrapolation den "100%-Wert" des "freien" Liganden zu ermitteln, also den Wert von F. Diese Ergebnisse wurden an Gelen ermittelt, die keinen Binder, also auch keine P^*Q -Komplexe enthielten und die mit Wasser eluiert wurden (also $P^* = T$, T = eingesetzte Radioaktivität). Näherungsweise kann angenommen werden, daß bei der weiteren Elution von Gelen mit einpolymerisierten Bindern die über den "100%-Wert" hinausgehenden Mengen von P^* auf die "Nachdissoziation" von P^* aus den P^*Q -Komplexen und nachfolgende Diffusion aus

dem Gel zurückzuführen ist. Dies wird auch durch die in Abb. 4 dargestellten Ergebnisse bestätigt, die an Gelen mit einpolymerisierten Bindern gewonnen wurden. Die Elution dieser Ansätze mit Aceton zeigte einen ähnlichen Verlauf wie die Elution der Gele ohne Binder. Die Elution der binderhaltigen Gele mit Wasser jedoch zeigte deutlich einen zweiphasigen Verlauf. Zunächst wird praktisch ausschließlich und vollständig die Ligandenmenge eluiert, die bei der Inkubation nicht von Antikörpermolekülen gebunden worden ist, und die jetzt mit der Elution aus dem Gleichgewicht der Assoziation entfernt wird. In der zweiten Phase der wäßrigen Elution wird die Ligandenmenge eluiert, die während der Inkubation von Antikörpermolekülen gebunden worden ist, und die jetzt aus diesen Komplexen abdissoziiert, um das Assoziationsgleichgewicht wieder herzustellen.

Die in der ersten Phase (2 Minuten) eluierte Ligandenmenge wird vereinfachend als 80 % der Menge des "freien" Liganden F bezeichnet und die in der zweiten Phase eluierte Ligandenmenge als Rest von F und hauptsächlich als Teil der Menge des "gebundenen" Liganden B bezeichnet ($B + F = T$; $T - F = B$). Wie in Abb. 5 dargestellt, ist bei konstantem T der Wert von F um so niedriger, also der Wert von B um so größer, je niedriger die Temperatur gehalten wird. Es ist also möglich, im Van't Hoff-Diagramm die Temperaturabhängigkeit von K_{Gel} aufzutragen und damit die apparente Reaktions-Enthalpie (und somit auch die apparente Reaktions-Entropie) zu bestimmen (s. Diss. Link, München, 1977). Infolge des offenbar großen Enthalpie-Gliedes (Abb. 5) muß bei Bindungsstudien mit immobilisierten Antikörpern sorgfältig auf Temperaturkonstanz geachtet werden, wenn auf reproduzierbare Elutionsmengen von P^* Wert gelegt wird.

Nach der thermodynamischen Charakterisierung der Reaktion der immobilisierten Binder Q_{Gel} (in Polyacrylamid

einpolymerisierte Anti-Östron-, Anti-Östradiol-17 β - und Anti-Östriol-Antisera) mit den korrespondierenden markierten Indikator-Liganden P* (^3H -Östron, ^3H -Östradiol-17 β , ^3H -Östriol) (Gl. 1a), konnte die Wirkung der Konkurrenzreaktion, die Reaktion des Binders mit unmarkierten Liganden ("Analyten") P (Östron, Östradiol-17 β , Östriol) studiert werden (Gl. 1b). Hierzu wurden konstante Mengen des Indikators und variable Mengen des "Analyten" gleichzeitig auf die korrespondierenden immobilisierten Antikörper gegeben oder es wurde das Antikörpergel mit dem Indikatorligand^{en} präinkubiert, anschließend getrocknet und nach dem Verfahren der "Sequentialinkubation" mit variablen Mengen des "Analyten" inkubiert. Erwartungsgemäß wurden nach den entsprechenden Inkubationen die eluierten Mengen des "freien" Indikatorliganden um so größer, je größer die Mengen der konkurrierenden "Analyten" bzw. "Standards" waren (Abb. 8a, 8b). Das heißt, es war möglich, für jeden Analyten "Standard-Kurven" zu erstellen (Abb. 9a, b, c). Mit der Sequentialmethode wurde zwar ein Pipettierschnitt erspart, aber die Flachheit der resultierenden Standard-Kurve (Abb. 9b), deren Ursache unbekannt blieb, zeigt, daß dieses Verfahren zur mikroanalytischen Bestimmung von Östrogenen nicht geeignet zu sein scheint. Mit der Methode der gleichzeitigen Inkubation von "Indikator" und "Analyt" mit den immobilisierten Antikörpern wurden jedoch für Östradiol-17 β und Östriol Ergebnisse erzielt (Abb. 9a, c), die eine Anwendung dieses Verfahrens als analytische Methode zur Östrogen-Bestimmung erlauben. Warum sich für Östron nicht ähnliche Verhältnisse ergaben, blieb unbestimmt.

In der Literatur ist offenbar erst eine Arbeit erschienen, in der über die Anwendung von einpolymerisierten Antikörpern zur Bestimmung eines Steroids (Östriol) berichtet worden ist (12). Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit fehlen dort jedoch Angaben über die Wirkung systematischer Variationen der Versuchsbedingungen. Die Autoren setzen nicht das getrocknete Gel ein und sie trennen die "gebundene" von der "freien" Fraktion des Indikatorliganden durch Zentrifugieren und anschließendes Dekantieren des Überstandes. Das hier beschriebene Verfahren, Auftragen von Analyt und Indikator auf trockenes Gel und das Eluieren der "freien" Fraktion des Liganden wird als vorteilhaft angesehen, da es u. a. vom manuellen Geschick des Untersuchers weniger abhängig ist und bei vorhandener Mechanisierung einfacher zu handhaben ist.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine Festphasentechnik zur Bestimmung von Östrogenen entwickelt.

Anti-Östrogen- (-Östron-, -Östradiol-17 β -, -Östriol-) C₆-Konjugat-Antikörper werden in Polyacrylamid-Gel einpolymerisiert, das Gel wird anschließend zerkleinert, mit Aceton dehydratisiert und getrocknet. Das Trockengel wird in kleine Säulchen eingewogen und durch Aufpipettieren der Lösung von markierten Liganden (Indikatorliganden) und unmarkierten Liganden (Analyten) rehydratisiert. Nach Erreichen des Reaktionsgleichgewichtes zwischen immobilisierten Bindern und Liganden wird das ungebundene Hapten eluiert und dessen Gehalt an markierten Liganden gemessen. Es wurde gezeigt, daß der Antikörper seine Bindungsfähigkeit behält und daß "Standardkurven" mit guter Reproduzierbarkeit gewonnen werden können.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ekins, R.P.: General principles of hormone assay;
in: Hormone Assays and their Clinical Application,
edited by Loraine, J.A., and E.T.Bell, Churchill
Livingstone, Edinburgh, 1976, pp. 2-72.
2. Boltin, A.E., and W.M.Hunter: The use of antisera
covalently coupled to agarose, cellulose and sephadex
in radioimmunoassay systems for proteins and haptens;
Biochem. Biophys. Acta 329 (1973) 318-330.
3. Moore, P.H., Jr., and L.R.Axelrod: A solid-phase radio-
immunoassay for estrogen by estradiol-17 β antibody
covalently bound to a waterinsoluble synthetic polymer
(enzacryl AA); Steroids 20 (1972) 199-212.
4. Bodley, F.H., A.Chapdelaine, G.Flickinger, G.Mikhail,
S.Yaverbaum, and K.D.Roberts: A highly specific radio-
immunoassay for progesterone using antibodies covalent-
ly linked to arylamine-glass particles; Steroids 21
(1973) 1-16.
5. Schäfer, A., H.Faulstich, P.Vecsei, and H.Hobler:
A solid-phase radioimmunoassay for urine aldosterone
using antibodies linked to nylon nets; FEBS-Lett. 48
(1974) 230-234.
6. Maurer, H.R.; in: Diskelektrophorese. Theorie und
Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-
Elektrophorese; Walter de Gruyter, Berlin, 1968.

7. Goodfriend, T., D. Ball, and S. Updike: Antibody in polyacrylamide gel, a solid phase reagent for radioimmunoassay. *Immunochemistry* 6 (1969) 481-484.
8. Kuss, E., and R. Goebel: Determination of estrogens by radioimmunoassay with antibodies to estrogen-C6-conjugates: I. Synthesis of estrone-, estradiol-17 β -, and estriol-6-albumin conjugates. *Steroids* 19 (1972) 509-518.
9. Herbert, G.A., P.L. Pelham, and B. Pittman: Determination of the optimal ammonium sulfate concentration for the fractionation of rabbit, sheep, horse, and goat antisera. *Appl. Microbiol.* 25 (1973) 26-36.
10. Updike, St.J., J.D. Simmons, D.H. Grant, J.A. Magnuson, and T.L. Goodfriend: Gel entrapment of antibody: A new strategy for facilitating both manual and automated radioimmunoassay. *Clin. Chem.* 19 (1973) 1339-1344.
11. Goldstein, L.: Kinetic behavior of immobilized enzyme systems. *Meth. Enzymol.* 44 (1976) 397-443.
12. Loriaux, D.L., R. Guy, and M.B. Lipsett: A simple, quick, solid-phase method for radioimmunoassay of plasma estradiol in late pregnancy and of plasma cortisol. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 36 (1973) 788-790.

LEBENS LAUF

Günther Josef Rußwurm, geboren am 13.2.1950 in München
als einziger Sohn der Eheleute Robert Rußwurm und
Hermine Rußwurm, geb. Ellmann.

1956 - 1961 Besuch der St.-Anna-Volksschule in München

1961 - 1970 Besuch des Luitpold-Gymnasiums in München

Juni 1970 Reifeprüfung

1970 - 1976 Humanmedizinstudium an der Universität München

Juni 1976 medizinisches Staatsexamen

August 1976 - November 1977 Medizinalassistentenzeit in
München und Trostberg

Dezember 1977 Approbation als Arzt

Dezember 1977 - April 1978 Assistenzarzt der internen
Abteilung des Kreiskrankenhauses Trostberg

Nach vorzeitiger Entlassung aus der Bundeswehr seit

Juli 1978 Assistenzarzt der internen Abteilung des Kreis-
krankenhauses Burghausen mit dem Berufsziel Internist.

